製品コード T7104A

研究用

TaKaRa

Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate

説明書

v201211_2

Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate は、ウェスタンプブロット検出において、タンパク質を転写したメンブレン上で反応した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗体を非常に高い感度で検出することができる化学発光基質です。Western BLoT HRP Substrate シリーズ中で最も高感度な検出試薬で、生じるシグナルが極めて強く、フェムトグラム・オーダーのタンパク質を検出できます。
本製品は非常に強いシグナルが持続するため、CCD カメラを用いた検出に適しています。
また、X 線フィルムでも高感度に検出することが可能です。ただし、発光強度が極めて高いため、X 線フィルムを用いて検出する場合は、露光時間の短縮や抗体の希釈などが必要となることがあります。

I. キットの内容（100 ml、メンブレン 1,000 cm² 分）

Western BLoT Ultra Sensitive Luminol/Enhancer Solution	50 ml（遮光ボトル）
Western BLoT Ultra Sensitive Peroxide Reagent	50 ml（透明ボトル）

II. 保存

4℃

III. キット以外に必要なもの

1. タンパク質を転写したメンブレン：

   適切なプロトコールを用いてタンパク質を電気泳動し、ウェスタンブロット用メンブレンに転写します。転写後のメンブレンを保存する場合には、TBS-T もしくは PBS-T（0.05% Tween®20 を含む TBS または PBS）に浸して 4℃で保存します。ニトロセルロースメンブレンおよび PVDF メンブレンのどちらも使用可能です。PVDF メンブレンを使用する場合は、適切なプロトコールにしたがって、転写に使用する前に十分に水和してください。

2. 希釈バッファーおよび洗浄バッファー：

   希釈バッファーは、TBS または PBS を使用します。洗浄バッファーは、TBS-T または PBS-T を使用します。

   以下の製品を使用すると簡便に調製ができます。

   ・TBS：Tris Buffered Saline (TBS) Tablets, pH7.6（製品コード T9141）
   ・PBS：Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, pH 7.4（製品コード T9181）
   Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets without Potassium, pH 7.4（製品コード T9182）
   ・TBS-T：Tris Buffered Saline with Tween®20 (TBS-T) Tablets, pH 7.6（製品コード T9142）
   ・PBS-T：Phosphate Buffered Saline with Tween®20 (PBS-T) Tablets, pH 7.4（製品コード T9183）

3. ブロッキングバッファー：

ブロッキング剤は、TBS-T または PBS-T を使用して溶解します。必ず希釈バッファーと同じ基本組成のバッファーを使用して溶解してください。

ブロッキング剤の例：

・スキムミルク：推奨濃度 1 ～ 5%
はじめは 5%で検討します。もっとも一般的なブロッキング剤ですが、リン酸化タンパク質の検出には使用できません。

・BSA：0.3 ～ 3%

・ゼラチン：約 2%
ビオチン標識二次抗体の使用時には適していません。

注：ブロッキングバッファーについては、V. 操作上の注意を参考にしてください。

4. 一次抗体：

目的タンパク質に特異的な抗体を選び、希釈バッファーを用いて抗体のストック溶液（1 mg/ml）を調製した後、ブロッキングバッファーで希釈して使用します。必要な抗体濃度は一次抗体の特異性やメンブレン上の抗原の量に左右されるため、各実験系で最適化する必要があります。希釈バッファーの代わりに、Western BLoT Immuno Booster（製品コード T7111A）を使用することで検出感度を向上させることができます。詳しくは、同製品の取扱説明書をご覧ください。

5. HRP 標識二次抗体：

使用する一次抗体に対応した HRP 標識抗体のストック溶液（1 mg/ml）を調製した後、ブロッキングバッファーで希釈して使用します。最適な希釈率は、HRP 標識抗体とメンブレン上の抗原量に依存するため、各実験系で最適化する必要があります。希釈バッファーの代わりに、Western BLoT Immuno Booster（製品コード T7111A）を使用することで検出感度を向上させることができます。詳しくは、同製品の取扱説明書をご覧ください。

6. CCD カメラ

（X 線フィルム検出の場合は、フィルムカセット、現像液、定着液など）

7. トレイ（メンブレンが入る大きさのもの）

8. シェーカー：

抗体反応、洗浄等にメンブレンを振盪するために使用します。

9. ラップ

10. プラスチック製ピンセット

IV. 操作上の注意

本製品を使用する時の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

1. 使用するサンプル量、一次抗体や二次抗体の濃度、メンブレンやバッファー、ブロッキングバッファーの種類などは、各実験系でそれぞれ最適化することが重要です。Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate は感度が非常に高いため、市販されている一般的な基質に比べて使用するサンプルや一次抗体および二次抗体の量を減らす必要があります。

2. 発色法に比べて、必要な抗体濃度は非常に低くなります。あらかじめドットブロット法で予備検討を行って、適切な抗体濃度に最適化してください。

3. 全ての実験系に共通で使用可能なブロッキングバッファーは存在しないため、各実験系に適切なブロッキングバッファーを選定することが重要です。最適なブロッキングバッファーの使用により、感度を上げ、非特異的なシグナルを抑えることができます。

4. 洗浄バッファー、ブロッキングバッファー、抗体溶液、Western BLoT Ultra Sensitive Working Solution はメンブレンを覆うのに十分な量を使用し、メンブレンが乾かないように注意してください。また、十分量のブロッキングバッファーや洗浄バッファーを使用することにより、非特異的なシグナルを減らすことができます。

5. ドライミルク（Non-Fat Dry Milk）は本システムのブロッキングバッファーとして使用できます。

   注意：ドライミルクにはビオチンやリン酸化タンパクが含まれるため、アビジン - ビオチン検出系、リン酸化タンパク質の検出系には、使用できません。

6. 最適な結果を得るために、各インキュベーション時ではロータリーシェーカーを使用してメンブレンを十分に振盪してください。

7. 非特異的なシグナルを減らすため、ブロッキングバッファーや全ての希釈抗体溶液の調製には 0.05% Tween®20 を加えてください。

8. バッファーの保存剤としてアジ化ナトリウムを使用しないでください。アジ化ナトリウムは HRP の阻害剤のため、本システムの反応を阻害することがあります。

9. メンブレンは素手では扱わず、常にパウダーフリーの手袋を着用するか、プラスチック製ピンセットを使用してください。使用する器具は全て、汚れや異物の付着がないものを使用し、はさみ等の金属製の器具は、錆びのないものを使用してください。錆は、シグナルのムラや高いバックグラウンドの原因となることがあります。

10. Western BLoT Ultra Sensitive Working Solution は室温で数時間安定ですが、直射日光や強い光により Working Solution の安定性に影響が出ることがあります。調製した Working Solution は遮光ボトルに入れるか、アルミホイルで包んで遮光し、調製後できるだけ早く使用してください。

V. 使用方法

1. ブロッキング：

メンブレン 1 cm^2 あたり 0.5 ml 以上のブロッキングバッファーをトレイに用意する。ウェスタンブロット装置からメンブレンを取り出し、ブロッキングバッファーに浸す。室温で 1 時間もしくは2～8℃で一晩振盪する。ブロッキングバッファーを捨て、十分量の新しい洗浄バッファーで 2 回すすぐ。

2. 一次抗体反応：

あらかじめ一次抗体を適切な濃度にブロッキングバッファーで希釈する。本キット使用において推奨される抗体濃度は次の通りである。

【ストック抗体溶液（1 mg/ml）の推奨希釈率】

一次抗体　　1：3,000 ～ 1：30,000
二次抗体　　1：10,000 ～ 1：300,000

ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体にメンブレンを浸し、室温で 1 時間、もしくは 4℃で一晩振盪する。メンブレンを十分量の新しい洗浄バッファーで軽く 2 回すすぐ。新しい洗浄バッファーに浸し、室温で振盪して洗浄する。

【洗浄条件】

5 分×4～6 回（メンブレン 1 cm^2 あたり 4 ml の洗浄バッファーを使用）

※ X 線フィルムを用いて検出する場合はバックグラウンドを抑制するために 6 回洗浄する。

3. 二次抗体反応（HRP 標識二次抗体）：

ブロッキングバッファーで希釈した標識二次抗体にメンブレンを浸し、室温で 1 時間振盪する。メンブレンを十分量の新しい洗浄バッファーで軽く 2 回すすぐ。
新しい洗浄バッファーに浸し、室温で振盪して洗浄する。

【洗浄条件】

5 分×4～6 回（メンブレン 1 cm^2 あたり 4 ml の洗浄バッファーを使用）

※ X 線フィルムを用いて検出する場合はバックグラウンドを抑制するために 6 回洗浄する。

4. 検出：

開栓前に本キットを室温にもどす。Luminol/Enhancer Solution と Peroxide Reagent を等量混合して、Working Solution を調製する。メンブレン 1 cm^2 あたり 0.1 ml の Working Solution が必要である。8 × 10 cm のメンブレンの場合、各試薬 4 ml を混合して、合計 8 ml の Working Solution を調製する。Working Solution は使用直前に調製する。

メンブレンから余分なバッファーを除く。
ラップ上にブロット面が上になるようにメンブレンを水平に置き、表面張力を利用して全体を覆うように Working Solution をかける。

室温で 5 分間静置する。

↓

メンブレンをピンセット等で持ち上げて、メンブレンの端をキムワイプなどにつけて余分な Working Solution を除去する。
メンブレンを新しいラップや OHP シートで包む。ブロット面の上はラップが 1 枚となるようにする。この時、気泡が入ったり、しわにならないよう注意する。

↓

化学発光を検出する。

《CCD カメラで検出する場合》
メンブレンを機器にセットして、検出する。検出条件（感度、解像度、露出時間など）は、機器のマニュアルに従って調整する。適当な露出が得られたら、画像を保存する。

《X 線フィルムで検出する場合》
フィルムカセットにメンブレンをブロット面が上となるようにセットする。その上に X 線フィルムをのせ、カセットを閉じる。最初の推奨露光時間は 60 秒だが、最適な結果が得られるよう露光時間を調節する。X 線フィルムを現像する。

VI. トラブルシューティング

ウェスタンブロッティングには複数のステップがあるため、条件の至適化が必要になる場合があります。電気泳動にかけるタンパク質の適切な量、一次抗体や二次抗体の最適な希釈率などを予備検討を行って決定することをおすすめします。

問題	原因	解決策
バックグラウンドが高い	使用した一次抗体の濃度が高すぎる	一次抗体の希釈倍率を上げて抗体濃度を下げる
	使用した HRP の濃度が高すぎる	二次抗体の希釈倍率を上げて HRP 濃度を下げる
	使用した抗原の量が多すぎる	使用する抗原の量を減らす
	ブロッキングが不十分	ブロッキング条件を最適化する
	ブロッキング剤が不適切	ブロッキング剤の種類を変える
	露光時間が長すぎる（X 線フィルムの場合）	露光時間を短くする
	洗浄が不十分	洗浄の時間や回数、洗浄バッファーの量を増やす
バンドが見えない、またはシグナルが弱い	一次抗体が不適切	一次抗体が正しいかどうか確認する
	二次抗体の種類が不適切	二次抗体が一次抗体を認識することを確認する
	抗原や抗体の量が不十分	抗原、または抗体の量を増やす
	タンパク質の転写が不十分	転写条件を最適化する
	使用した HRP の濃度が高すぎる（基質が枯渇し早期にシグナルが減衰する原因となる）	二次抗体の希釈倍率を上げて HRP 濃度を下げる
	露光時間が短い（X 線フィルムの場合）	露光時間を長くする
	HRP や基質の活性低下	新しい試薬を使用する。WorkingSolution は検出の直前に調製し、数時間以内に使用する。
バンドの中に白い点がある	タンパク質の転写効率が悪い	転写条件を最適化する
	メンブレンの水和が不均一	メンブレンを適切に水和する
	ゲルとメンブレンの間の気泡	転写の際に気泡を確実に除く
	フィルムとメンブレンの間の気泡（X 線フィルムの場合）	露光の前に気泡を確実に除く
バックグラウンドにムラがある	二次抗体が凝集している	二次抗体をろ過する
	ブロッキングバッファーや洗浄バッファーにホコリなどの微細片が混入している	ブロッキングバッファーや、洗浄バッファーをろ過する。クリーンな環境で実験を行い、インキュベーションや洗浄中は蓋をする。
	使用した手袋が不適切	パウダーフリーの手袋を使用するか手袋の種類を変える（ニトリル製、ポリエチレン製など）
メンブレンが暗所で光る、メンブレン上に褐色のバンドがある、フィルムのイメージが反転	使用した HRP 濃度が高すぎる	二次抗体の希釈倍率を上げて HRP 濃度を下げる
非特異的バンドが出る	シグナルの持続時間が短く露光時間が長い (HRP が過剰）	二次抗体の希釈倍率を上げて HRP 濃度を下げる
	使用した一次抗体の濃度が高すぎる	一次抗体の希釈倍率を上げて抗体濃度を下げる

VII. 関連製品

＜ Westen BLoT HRP Substrate シリーズ＞

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate （製品コード T7101A）
Western BLoT Quant HRP Substrate （製品コード T7102A）
Western BLoT Hyper HRP Substrate （製品コード T7103A）

＜ウェスタンブロット化学発光エンハンサー＞

Western BLoT Immuno Booster （製品コード T7111A）

＜ HRP 標識二次抗体の代りに＞

Western BLoT Rapid Detect （製品コード T7121A）

Tris-Glycine-SDS Buffer (TG-SDS) Powder, pH 8.3 （製品コード T9101）
Tris-Glycine Buffer (TG) Powder, pH 8.3 （製品コード T9102）
Tris Buffered Saline (TBS) Tablets, pH7.6 （製品コード T9141）
Tris Buffered Saline with Tween®20 (TBS-T) Tablets, pH 7.6 （製品コード T9142）
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, pH 7.4 （製品コード T9181）
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets without Potassium, pH 7.4 （製品コード T9182）
Phosphate Buffered Saline with Tween®20 (PBS-T) Tablets, pH 7.4 （製品コード T9183）
Porablot PVDF (0.25 × 3 m, 1 roll) （製品コード 741260）
Porablot PVDF (200 × 200 mm, 10 sheets) （製品コード 741261）

VIII. 注意

・ 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

L58：HRP Substrate
The products are manufactured and patented by Cyanagen s.r.l and protected by US7803573; EP1962095; US7855287; EP1950207 US2012009603(A1); CA2742025; EP2405016 and foreign equivalents and other pending patents.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/
タカラバイオ株式会社